

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-526381

(P2001-526381A)

(43) 公表日 平成13年12月18日 (2001. 12. 18)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード* (参考)
G 0 1 N 27/62		G 0 1 N 27/62	V 2 G 0 4 5
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 2 4
G 0 1 N 27/64		G 0 1 N 27/64	B 4 B 0 6 3
33/50		33/50	P
33/566		33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 51 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-524469 (P2000-524469)
 (86) (22) 出願日 平成10年12月4日 (1998. 12. 4)
 (85) 翻訳文提出日 平成12年6月5日 (2000. 6. 5)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP98/07911
 (87) 国際公開番号 WO99/29898
 (87) 国際公開日 平成11年6月17日 (1999. 6. 17)
 (31) 優先権主張番号 97121471. 3
 (32) 優先日 平成9年12月5日 (1997. 12. 5)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (81) 指定国 EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, US

(71) 出願人 マックス・プランク・ゲゼルシャフト・ツ
 ア・フェルデルング・デア・ヴィッセンシ
 ャフテン・エー・ファオ
 ドイツ連邦共和国 ベルリン (番地な
 し)
 (72) 発明者 イヴォ・グリュンネ・グート
 フランス75014パリ、リュ・デュ・ムーラ
 シ・ヴェール18番
 (72) 発明者 クルト・ベルリン
 ドイツ連邦共和国デー14532シュター
 スドルフ、マリーエンケーファーヴェーク
 4番
 (74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外1名)

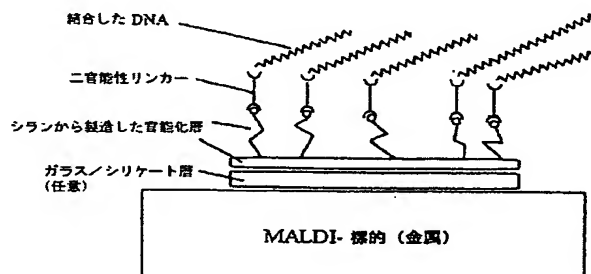
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マトリックス補助レーザー脱着/イオン化質量分光分析による核酸の同定方法

(57) 【要約】

本発明は、マトリックス補助レーザー脱着/イオン化質量分光分析による、異なる質量の前以て決定したプローブを用いた核酸分子中のヌクレオチド配列の検出方法に関する。本発明の方法の利点の一つは、異なるプローブのセットにより種々の未知の核酸分子を同時に特徴付けることができることである。さらに、本発明は、プローブおよび/またはプローブ支持体 (任意に核酸分子が結合している) を含むキットに関する。

MALDI 標的への DNA の直接の固定化 (例示)



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記工程を含む、核酸分子中のヌクレオチド配列の検出方法：

- (a) 異なるヌクレオチド塩基配列のプローブのセットとの核酸分子のハイブリダイゼーションであって、その際、各プローブは他のすべてのプローブとは異なる質量を示す；
- (b) ハイブリダイズしなかったプローブの分離；
- (c) レーザー光によりプローブの脱着を支援するマトリックスへのハイブリダイズしたプローブの接触；
- (d) ハイブリダイズし電導性物質からなるプローブ支持体上のマトリックスにより囲まれたプローブの質量分光分析計での分析；および
- (e) 配列を示す核酸分子の決定、その際、プローブ支持体上のプローブの位置がそれと結合した核酸分子への割り当てを可能にする。

【請求項2】 工程(a)の前または後に核酸分子を担体の表面に移す、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 該担体の表面が、電導性物質からなるプローブ支持体の表面である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 工程(c)の前に、その表面に核酸分子が適用されハイブリダイズしたプローブを有する担体を、電導性物質からなるプローブ支持体に適用する、請求項2に記載の方法。

【請求項5】 工程(c)において、ハイブリダイズしたプローブを、マトリックスとの接触前、接触後または接触中に固定化核酸分子から分離させる、請求項2に記載の方法。

【請求項6】 プローブ支持体が、金属である表面、ガラスをコーティングした表面、または化学的に修飾した表面を有する、請求項1ないし5のいずれか一つに記載の方法。

【請求項7】 核酸分子のプローブ支持体への固定が、 NH_2 -官能基、エポキシ官能基若しくはSH-官能基を介し、シリケートもしくはシランでのプローブ支持体表面のコーティングによって、タンパク質-基質相互作用、タンバ

【請求項19】 修飾が、ホスホロチオエートおよび/またはRNA塩基および/またはホスホトリエステル結合のプローブ内への導入である、請求項18に記載の方法。

【請求項20】 マトリックスが、アセトン中の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸の1：9ないし9：1の比、好ましくは1：1の比の溶液、または α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸またはシナピン酸またはそのメチル誘導体との1：9ないし9：1の比、好ましくは1：1の比の混合物である、請求項1ないし19のいずれか一つに記載の方法。

【請求項21】 マトリックスが、アセトン中の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸の1：9ないし9：1の比、好ましくは1：1の比の溶液、または α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸またはシナピン酸またはそのメチル誘導体との1：9ないし9：1の比、好ましくは1：1の比の混合物であり、アセトン、イソプロパノール、アセトニトリル、エタノール、メタノールもしくは水またはこれら溶媒の2またはそれ以上の混合物中の溶液としてMALDIプローブ支持体に適用する、請求項1ないし19のいずれか一つに記載の方法。

【請求項22】 プローブが異なる質量および/または電荷タグを有する部分ライブラリーとして製造される、請求項1ないし21のいずれか一つに記載の方法。

【請求項23】 (a) 請求項11ないし18のいずれか一つに記載のプローブセット、および/または

(b) 前処理されており、それゆえ標的DNAのアレイの結合が可能であるか、および/またはすでに結合した標的DNAを含むプローブ支持体を含むキット。

ク質-タンパク質相互作用もしくはタンパク質-核酸相互作用、または2つの疎水性成分間の相互作用によって行、請求項1ないし6のいずれか一つに記載の方法。

【請求項8】 タンパク質-基質相互作用が、ビオチン-ストレプトアビジン結合または抗体-抗原結合である、請求項7に記載の方法。

【請求項9】 タンパク質-核酸相互作用が遺伝子3'2'-核酸結合である、請求項7に記載の方法。

【請求項10】 プローブが質量タグを有する核酸である、請求項1ないし9のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】 質量タグが電荷タグでもある請求項10に記載の方法。

【請求項12】 核酸がさらに電荷タグを有する、請求項10に記載の方法。

【請求項13】 プローブが修飾した核酸分子である、請求項1ないし12のいずれか一つに記載の方法。

【請求項14】 修飾した核酸分子が、PNA、アルキル化ホスホロチオエート核酸またはアルキルホスホネート核酸である、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 プローブがコンビナトリアル固相合成により製造される、請求項1ないし14のいずれか一つに記載の方法。

【請求項16】 種々の塩基構築ブロックが、それにより合成された各プローブがその質量により質量分光分析計で互いに区別できるような仕方でマーキングされている、請求項15に記載の方法。

【請求項17】 マーキングが、メチル基、エチル基、プロピル基、分枝鎖若しくは直鎖アルキル基、ハロゲン置換された分枝鎖若しくは直鎖アルキル基、アルコキシアルキル基、アルキルアリール基、アリールアルキル基、アルコキシアリール基、またはアリールオキシアルキル基、または、その重水素化された変異体若しくは他の同位体変異体である、請求項16に記載の方法。

【請求項18】 プローブが、ランダムなヌクレオチドから離れた定められた位置に少なくとも1つの修飾を有し、それによりプローブの開裂が可能になる、請求項14ないし17のいずれか一つに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(技術分野)

本発明は、マトリックス補助レーザー脱着/イオン化質量分光分析による、異なる質量の前記で決定したプローブを用いた核酸分子中のヌクレオチド配列の検出方法に関する。本発明の方法の利点の一つは、異なるプローブのセットにより種々の未知の核酸分子を同時に特徴付けることができることである。さらに、本発明は、プローブおよび/またはプローブ支持体（任意に核酸分子が結合している）を含むキットに関する。

【0002】

核酸を正確に特徴付けることは非常に複雑で、高価につくものである。不明なDNAはシーケンシングにより特徴付けることができる。これがDNAを分析するのに最も正確な方法である。しかしながら、DNAのシーケンシングは多大な時間および労力を要し、全配列に関心がもたれる場合に必要であるにすぎない。非常に短いDNA部分(<1000ヌクレオ塩基)のみが一つの工程でシーケンシングされ得る。1000ヌクレオ塩基よりも長いDNA断片を一層大きいスケールで分析しなければならない場合にはDNAを分割することが必要となり、よりこの手法は高価になる。

【0003】

しかしながら、より低い解決ではあるが多くの言明を行うことができる。しかしながら、現在までに記載された方法は、放射性物質を使用する必要があり、1つの分析にたった1つのプローブしか使えないという点で不利である。そのような従来技術の方法は、たとえば、種々の標的DNAのアレイを用いてある種の情報を探索することを含む。何千もの標的DNAを含むアレイを固相に固定化し、ついでプローブ（相補配列を持つ核酸）を用いてある配列の存在について全ての標的DNAと一緒に調べることもできる^{1,2}。プローブと標的DNAとの一致は、両核酸のハイブリダイゼーションにより確認することができる。プローブは種々の長さのいかなる核酸配列であってもよい。最小限にしか互いに重複しない、プローブ配列の至適ライブラリーを選択する様々な方法が存在する^{3,4}。プロ

ープ配列は、特定の標的DNAを見つけ出すために特別に編成することができる。この技術を利用した一つの方法は、オリゴフィンガープリンティングである。標的DNAのライブラリーを短い核酸プローブで走査する。通常、そのためのプローブは8~12塩基の長さである。1つのプローブが、ナイロン膜に固定化された標的DNAライブラリーと同時にハイブリダイズされる。プローブは放射能で標識されており、ハイブリダイゼーションは放射能の位置により判定される。固定化されたDNAアレイの走査にはまた、蛍光によりマーキングしたプローブもまた用いられている⁶。類似の方法が、DNAシーケンシングのマルチプル化のために用いられている^{6,7}。標的配列のクローニングのため、種々のベクター系が用いられる。各一つのクローンを各クローニングベクターによりブールし、配列決定反応が行い、断片をゲル上で分離し、ゲルをナイロン膜上にプロットする。続いて、それぞれのクローニング系に属する配列が得られるように、クローニング系の種々の配列を固定化DNAとハイブリダイズさせる。ここで、クローニング系の走査はまた質量分光分析により検出可能なプローブによっても行うことができる。

【0004】

標的DNAと配列特異的に相互作用することができるいかなる分子をもプローブとして用いることができる。最も一般的に用いられているのはオリゴデオキシリボヌクレオチドである。しかしながら、この目的のためには、ペプチド核酸(PNA)^{8,10}、ホスホリチオエートオリゴヌクレオチドまたはメチルホスホネートオリゴヌクレオチドなどの核酸のあらゆる修飾が適している。プローブの特異性は非常に重要である。ホスホリチオエートオリゴヌクレオチドは特に好ましいわけではない、なぜなら、その構造が硫黄原子によって修飾されており、このことはハイブリダイゼーションの特性にマイナスの影響を及ぼすからである。このことは、ホスホリチオエートオリゴヌクレオチドが通常、ジステレオマーなしでは合成されないという事実にもよる。過去には、メチルホスホネートオリゴヌクレオチドでも同様の純度に関する問題があったが、これらオリゴヌクレオチドは、次第にジステレオマーなしで合成されるようになってきている。メチルホスホネートオリゴヌクレオチドとホスホリチオエートオリゴヌクレオチドとの本質

場合は、極めて微細な結晶化という結果となる幾つかの非常に効率的なマトリックスが見出されている。DNAの場合も現在までに幾つかの適当なマトリックスが見出されているが、感度の差異はこの方法によっては低減することができなかった。感度の差異は、ペプチドと類似するようになる仕方ではDNAを化学的に修飾することによって低減することができる。ホスホリチオエートオリゴヌクレオチドは通常のリン酸骨格がチオリン酸によって置換されたものだが、簡単なアルキル化の化学により電荷的に中性のDNAに変換することができる¹⁴。この修飾DNAに「電荷タグ」をカップリングさせると、ペプチドに認められるのと同レベルまで感度が上昇する結果となる^{15,16}。この修飾のために、ペプチドの脱離に使用するのと同様のマトリックスを使用できる可能性が浮上する。電荷タグのさらなる利点は、不純物に対する分析の耐性が上昇することであり、このような不純物は非修飾物質の検出を一層困難にするものである。PNAおよびメチルホスホネートオリゴヌクレオチドはMALDIにおいて調べられており、この方法で分析することができる^{17,18,19}。

【0006】

コンビナトリアル合成²⁰、すなわち前駆体の混合物から出発する物質ライブラリーの製造は、固相と液相の両方で行われる。とりわけ、コンビナトリアル固相合成は早くから確立されているが、それはこの場合には副産物の分離が特に簡単であるからである。担体(支持体)に結合された標的化合物のみが洗浄工程でも保持され、リンカーの特異的な分解により合成の最後に分離される。簡単な方法で、この技術は、固相上の多数の種々の化合物の同時合成を可能とし、それゆえ、化学的に「純粋な」物質ライブラリーを得ることを可能とする^{21,22,23}。それゆえ、固相上でのコンビナトリアルの従来の合成法では合成されない化合物のクラスも、特に簡単な方法でのコンビナトリアル化学に適したものとなる。このことが、それらが広く用いられる理由である。これは特にペプチド、核酸およびPNAライブラリーに当てはまる。

【0007】

ペプチドの合成は、最初のN-保護アミノ酸(たとえば、Boc)を支持体に結合させ、続いての脱保護、および第二アミノ酸と第一のアミノ酸のいまや遊離

的な違いは、前者が荷電していない骨格を有する結果、緩衝塩へのハイブリダイゼーションの依存がより低減し、全体として、反発の低減により親和性が高くなることである。ペプチド核酸もまた荷電していない骨格を持ち、このことにより同時に、核酸の骨格の一般的な糖-リン酸構造とは化学的特性が劇的に逸脱したものとなる。PNAの骨格は、通常のDNAの糖-リン酸骨格の代りにアミド配列を示す。PNAは、DNAに相補的である配列と非常によくハイブリダイズする。PNA/DNAハイブリッドの融解温度は、対応するDNA/DNAハイブリッドよりも高く、緩衝塩に対するハイブリダイゼーションの依存度もまた比較的低い。

【0005】

マトリックス補助レーザー脱離/イオン化質量分光分析(Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation Massenspektrometrie)(MALDI)は、生体分子の分析のための新規で非常に効率的な方法である¹¹。分析対象物分子を光吸収マトリックス中に包埋する。マトリックスを短レーザーパルスにより蒸気化し、かくして分析対象物は断片化されない形態で気相に移される。分析対象物のイオン化はマトリックス分子のパルスにより達成される。負荷した電圧は、ゼロ場飛行パイプでイオンを加速する。その質量が異なるため、イオンは異なって加速される。小さなイオンは大きなイオンよりも早く検出器に到達する。飛行時間はイオンの質量に変換される。技術的なハードの新規性は方法を有意に改している。ここで、遅延抽出(delayed extraction)(DE)¹²について言及しておくのは有意義である。DEの場合、加速電圧はレーザーパルス後の遅延によりオンに切り替えられ、それによってパルス数が減るのでシグナルの解析が向上する。MALDIはペプチドおよびタンパク質の分析に完全に適している。核酸の分析は一層難しい¹³。核酸に対する感度はペプチドに対する感度に比べて約100倍悪く、比例を上回る度合いで断片のサイズが大きくなるにつれて低減する。この理由は、ペプチドやタンパク質のイオン化のためには一つの単一プロトンのみが捕獲されるだけでよいからである。何重にも負に荷電した骨格を有する核酸では、マトリックスによるイオン化プロセスは週かに非効率的である。MALDIの場合は、マトリックスの選択が極めて重要な役割を果たす。ペプチドの脱離の

になったNH₂基との反応によって行われる。反応しなかったアミノ官能基は、次の合成サイクルにおいて引き続く反応のさらなる「キャッピング」工程で除去される。第二のアミノ酸のアミノ官能基の保護基を除去し、次の成分をカップリングすることができる。ペプチドライブラリーの合成では、アミノ酸の混合物を1またはそれ以上の工程で用いる。PNAおよびPNAライブラリーの合成も同様である。

【0008】

核酸ライブラリーは、通常、種々のホスホリアルミダイトヌクレオシドの混合物を用いた固相合成により得られる。このことは、市販のDNA合成機で合成プロトコルに変更を加えることなく行うことができる。さらに、PNAライブラリーのコンビナトリアル合成について種々の研究が刊行されている^{24,25}。これらの研究は、コンビナトリアル配列の構築、すなわち、配列中の単一の特定の塩基が変性塩基によって置換されており、それゆえランダムな配列変異が得られるPNAの合成を扱っている。コンビナトリアルライブラリーの分析のための質量分光分析法の使用は、繰り返し記載されてきて^{26,27,28,29}。

【0009】

DNAを固定化するための種々の方法が存在する。最もよく知られている方法は、ストレプトアビジンでコーティングした表面へのビオチンで官能化したDNAの固相結合である³⁰。この系の結合強度は、共有化学結合ではないにも関わらず、その強度に相当する。化学的に調製した表面に標的DNAを共有結合させるためには、標的DNAに対応する官能基が必要とされる。DNA自体は、それに適した官能基を有していない。標的DNAに適当な官能基を導入するための種々の方法が存在する：2つの簡単に取扱いすることができる官能基は、第一級脂肪族アミンとチオールである。そのようなアミンは、N-ヒドロキシスクシンイミドエステルにより定量的に変換される。チオールは、適当な条件下で定量的にヨウ化アルキルと反応する。一つの困難性は、そのような官能基をDNAに導入することである。最も容易な方法は、PCRのプライマーの導入である。記載された方法は、5'修飾プライマー(NH₂およびSH)および2官能性リンカーを用いている^{31,32,33}。

【0010】

表面上に固定する場合には、その性質が最も重要である。これまでに記載された系は、主として珪素または金属（マグネチックビーズ）からなる。標的DNAを結合させるための他の方法は、表面固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズさせるために標的DNA中の短い認識配列（たとえば、20塩基）を用いることに基づいている³⁴。酵素の変異体もまた、標的DNA中へ化学的に活性化された位置導入のために記載されている³⁵。ここでは、5'-NH₂官能化を標的DNA上で酵素的に行っている。

【0011】

上記のように、核酸の正確な分析に特に照準を定めた多くの方法が当該技術分野で知られている。これらの方法は、通常、時間と労力を要するかおよび/または費用がかかるものである。

【0012】

それゆえ、本発明の根底にある技術的な課題は、標的核酸の同定のための迅速かつコスト効率の高い方法を提供することである。

【0013】

この技術的な課題は、請求の範囲に記載される実施態様により解決される。

【0014】

従って、本発明は、下記工程を含む、核酸分子中のヌクレオチド配列の検出方法に関する：

- (a) 異なるヌクレオチド塩基配列のプロープのセットとの核酸分子のハイブリダイゼーションであって、その際、各プロープは他のすべてのプロープとは異なる質量を有する；
- (b) ハイブリダイズしなかったプロープの分離；
- (c) レーザー光によりプロープの脱着を支援するマトリックスへのハイブリダイズしたプロープの接触；
- (d) 電導性物質からなるプロープ支持体上のマトリックスにより囲まれたハイブリダイズしたプロープの質量分光分析計での分析；および
- (e) 配列を示す核酸分子の決定、その際、プロープ支持体上のプロープの位置

に用いることができる。たとえば、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が選択されれば、用いられるプロープはそのヌクレオチド塩基配列と正確に相補的な核酸配列とのみハイブリダイズすることができる。しかしながら、ストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件が選択されると、用いられるプロープは選択された条件下でのハイブリダイゼーションを依然として可能とする仕方でも該ヌクレオチド塩基配列から逸脱したあらゆるヌクレオチド配列を検出することができる。そのようにして、本発明の方法はまた、ある配列のホモログ、変異体または対立遺伝子を検出するのに用いることができる。当業者であればストリンジェントな条件およびストリンジェントでない条件がどのようなものであるか知っている（たとえば、Sambrookら、[A Laboratory Manual] 第2版、C SH Press, Cold Spring Harbor (1989年)；HamesおよびHiggins編 [Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach] IRL Press, Oxford (1985年)）。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件とは、たとえば、6×SSC、5×Denhardt試薬、0.5% SDS および 100 μg/ml 変性DNA中、65℃でのハイブリダイゼーション、および0.1×SSC、0.1% SDS中、65℃での洗浄である。ストリンジェントでないハイブリダイゼーション条件は、上記の条件とたとえば、ハイブリダイゼーションおよび洗浄が、たとえば50℃のより低い温度および/またはSSCの量が、たとえば1×もしくは2×SSCに増加させて行われる。

【0018】

本発明の方法はまた、標的DNA中の幾つかの異なる配列の検出を可能にし、その際、それら異なる配列は異なるプロープに相補的である。理想的には、たとえば、重複する配列を持つプロープを用いた場合、標的核酸の全ヌクレオチド配列を検出または解明し得る。

【0019】

本発明の方法ではまず最初に、選択された条件下でプロープにハイブリダイズし得る配列を示すプロープ支持体にプロープが適用されているかどうかを決定することができる。もし適用されておれば、プロープ核酸はさらに調べ、特徴付けることができる。本発明の方法では、プロープの一部のみを本発明の分析に用い

がそれと結合した核酸分子への割り当てを可能にする。

【0015】

本発明の方法は、標的核酸のアレイを分析する方法（オリゴフィンガープリンティング）と核酸および修飾核酸の質量分光分析法とを有利な仕方でも組み合わせたものである。それによって、多数の種々のプロープを用い、核酸分子中の1またはそれ以上のヌクレオチド配列を検出することができる。これらの方法の組み合わせはこれまでに行うことができなかった。というのは、プロープの質量による識別からは配列に関して明解な結論を得ることができず、核酸の質量分光分析の感度はオリゴフィンガープリンティング実験でのプロープ量に対応しなかったからである。ある種の配列の検出を可能とする条件は、標的配列とのハイブリダイゼーションを可能とする方法においてプロープを用いることである。核酸分子の決定は、プロープの一つでハイブリダイゼーションを試験することにより行うことができる。

【0016】

所望のヌクレオチド配列をハイブリダイゼーション法により正確に決定することは常に可能とは限らないことは当業者には明らかである。というのは、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件においてさえも、いわゆる「ミスマッチ」にも拘わらずプロープのハイブリダイゼーションが起こり得るからである（たとえば、プロープのある最小の長さから、またはハイブリダイゼーションの間に許容され得る1または複数のミスマッチの配置により）。プロープの所定のヌクレオチド配列では、核酸分子中の相補配列は、いくつかの部分は、実施態様のある種の推定によってしか決定することができないが、それは正確に相補的な配列とは別に、その配列が正確には相補的でない配列も決定できるからである。従って、ヌクレオチド配列はまた、90%よりも高い相同性、特に好ましくは95%よりも高い相同性の程度を示す相同なヌクレオチド配列をも含む。本発明は、上記の全ての態様を含む。

【0017】

ハイブリダイゼーション条件に依存して、本発明の方法は、特定のヌクレオチド配列かまたは類似の配列を有するヌクレオチド配列群のいずれかを検出するの

るなければならないので、用いなかった核酸はさらに標準法、たとえばシークエンシング法により調べることができる。

【0020】

本発明の方法はまた、2回以上、同時にまたは連続的に行うことができ、その際、ハイブリダイゼーション条件を変えることができる。この方法では、特定の配列の探索を開始する前に、たとえば、標的DNAアレイにおいて、どれだけのおよびいかなる標的DNAが高い相同性を示すかを決定することが可能である。

【0021】

ある位置にハイブリダイズしたプロープを、プロープ支持体上の固定化した試料に割り当てることは、好ましくは、データ処理システムを用いて行う。かかるデータ処理システムは、プロープ支持体上のある位置でそれぞれ記録したスペクトルを同じ場所に位置する標的DNAに割り当てるものである。

【0022】

上記のように、プロープ支持体は電導性の物質からなる。これにはまた、マトリックスによって囲まれたハイブリダイズしたプロープが配置されるプロープ支持体の表面が含まれる。この表面は、物質に関してプロープ支持体と異なっている。

【0023】

質量分光分析のためのプロープを直接または間接に固定化する表面は、質量分光分析のためのプロープ支持体として働き得るような仕方でも構成されていなければならない（図2）。このことは、プロープ支持体が電導性の物質からできていなければならないことを意味する。というのは、イオン化したプロープ分子の安定な加速を達成するために所定の電圧を負荷しなければならないからである。非電導性の表面は静電的な荷電に導くであろうが、このことは電圧の逸脱のために質量のシフトが観察されることおよび質量の割り当てが不可能であることを意味している。

本発明の好ましい態様を以下に記載するが、実施例にも記載してある。

【0024】

本発明の方法の好ましい態様では、工程(a)に従って核酸分子を担体の表面

に移す。適当な担体は、たとえば、ストレプトアビジン、アミノ基、SH基またはエポキシ基で官能化した「マグネチックビーズ」、プラスチックビーズまたはガラスビーズである。

特に好ましい態様では、担体の表面は電導性物質からなるプローブ支持体の表面である。この態様は比較的複雑でない仕方で行うことを可能にする。というのは、ハイブリダイゼーションが起こった後に核酸分子をプローブ支持体に移す必要がないからである。

【0025】

本発明の方法の特に好ましい態様では、その表面に核酸分子を有する担体を、電導性物質からなるプローブ支持体に工程(c)の前に適用する。結合は、たとえば、マトリックス自体によって、またはマトリックスにニトロセルロースを加えることによって達成できる。

同様に特に好ましい態様において、ハイブリダイズしたプローブを工程(c)においてマトリックスと接触させる前、接触させた後または接触させる間に固定化核酸分子から除去し、電導性物質からなるプローブ支持体に適用する。この態様において、ハイブリダイズした核酸分子とプローブとの複合体を変性させ、プローブのみをプローブ支持体に適用する。変性は、たとえばアルカリ変性または加熱変性などの公知の方法により、または酸性のマトリックス溶液自体により行うことができる。

【0026】

他の好ましい態様において、プローブ支持体は、ガラスをコーティングした金属表面または標的DNAの固相結合を可能とする化学的に修飾した表面のいずれかを有する。

本発明の方法のさらに好ましい態様において、プローブ支持体の表面上への核酸分子の固定化は、NH₂-官能基、エポキシ官能基若しくはSH-官能基を介し、シリケートもしくはシランでのプローブ支持体表面のコーティングによって、タンパク質-基質相互作用、タンパク質-タンパク質相互作用もしくはタンパク質-核酸相互作用、または2つの疎水性成分間の相互作用によって行う。

【0027】

端などの異なる位置に位置した幾つかの標識を有していてもよい。質量タグの数および位置の組み合わせにより、あるいは状況により電荷タグとの組み合わせにより、本発明の方法の柔軟性と感度が有意に向上する。

特に好ましい態様において、質量タグはまた電荷タグでもあり、一方、核酸は他の特に好ましい態様においてさらに電荷タグを有する。

【0030】

電荷タグの付加は、Gut^{11,12}の方法により行われ得る。アミノ官能化基質(1 mM)を、氷上のトリメチルアミン/CO₂緩衝液(pH=8.5、200 mM)に0℃で、ω-トリメチルアンモニウムヘキサノ酸-N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(CT)と共に添加する。30分後、揮発性の緩衝液及び溶媒を真空除去する。アミノ官能化基質は、たとえば、質量が異なる種々のプローブを用いてコンビナトリアル法により製造したライブラリーであってよい。基質ライブラリーの質量は、CTの長さおよび官能化を変えることにより、所定の量に変えることができる(図2)。コンビナトリアル合成の際に、200 Daの範囲で質量が異なる64個のプローブを含むプローブライブラリーが製造されるので(図4)、質量/電荷タグは各200 Daの単位で質量を増加させる。このことは、最初のコンビナトリアル合成生成物は可能な限り最小の電荷タグで生成され、第2のものは質量が200 Da多い質量/電荷タグで生成され、第3のものはさらに200 Da多い質量/電荷タグで生成される等々のことを意味する。理論的には、この範囲は任意に、用いる質量分光分析計が、2つの隣り合ったプローブの間の差異を無視できる限り、そして、その合成を実際に利用できる限り、増大することができる。10核塩塩基のプローブでは、2600~2800 Daの範囲の基礎質量を達成される。現在のところ利用可能な質量分光分析計では、十分な質量精度で使用できる質量範囲は、4000 Da以下である。従って、64プローブの7集団を用いることができる(全部で448プローブ)。この態様で得られた結果を図5および図6に示す。

【0031】

自動合成装置におけるペプチドの合成は、C末端からN末端へ行われ、核酸の合成は3'末端から5'末端へ向かって進められる。1または2の官能化により質

プローブ支持体が、たとえば金でコーティングされている場合には、標的DNAのカップリングは、標的DNAの分子生物学的製造の際に導入したSH-官能基またはNH₂-官能基により達成できる。この逆の態様、すなわち、修飾DNAを官能化した金粒子に結合することも可能である。たとえば、企業のNanoprobe Inc.、ストーニー・ブルック、ニューヨークは、ストレプトアビジンを結合したまたはアミノ官能基を結合した金ナノ粒子を販売している。以前にも記載したように、他の可能性は、プローブ支持体の金属表面をガラスでコーティングすることである。2官能性リンカー(たとえば、SILAB、Pierce Chemical、ロックビル、イリノイ、米国)に結合した標的DNAのSH-官能基によるカップリングは、アミノ官能基によりガラス表面に対して達成できる。他の態様は、金属表面をトリメトキシ-3-アミノプロピルシランで直接コーティングすることである。このアミノ官能基に上記2官能性リンカーにより標的DNAを引き続きカップリングすることができる。

【0028】

特に好ましい態様において、タンパク質-基質相互作用は、ビオチン-ストレプトアビジン結合または抗体-抗原結合である。MALDIプローブ支持体は通常、金属(たとえば、鉄)からなり、さらに修飾しないことにはタンパク質もDNA分子も固定化することができない。固定化の一つの可能性は、鉄表面に金をコーティングすることであるが、これにたとえばSH-官能基を結合させることができる。2官能性リンカーは、SH-官能基および標的DNAの官能化に対応する他の官能基を有するカップリングに適している。たとえば、標的DNAがビオチンで官能化されている場合には、リンカーはストレプトアビジンでカップリングしなければならない。標的DNAがNH₂-官能化されている場合は、リンカーはN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル官能基を有してよい。

【0029】

他の特に好ましい態様において、タンパク質-核酸相互作用は、遺伝子3'2、タンパク質結合単一DNAへの核酸の非特異的な結合である。

本発明の方法の他の好ましい態様において、用いるプローブは、質量タグを有する核酸である。この態様によれば、プローブはまた、たとえば5'末端と3'末

量をシフトさせることを目的として、1または2の末端に第一級アミノ官能基を結合することができる。代りに、コンビナトリアル法により製造されたプローブライブラリーの質量はまた、所定の質量の幾つかの構築ブロック(たとえば、PNAのコンビナトリアル合成におけるアミノ酸)をコンビナトリアル構築ブロックを導入する前に適用することによりシフトさせ得る。第一のコンビナトリアル合成は支持体上で直接開始される。第二のコンビナトリアル合成ではまず、たとえば2つのバリンをカップリングする。バリンは99 Daの質量を有する。2つのバリンを用いることにより、第二のコンビナトリアル合成から第一のコンビナトリアル合成へ198 Daだけ質量を変えることができる。第三のコンビナトリアル合成では、最初に4つのバリンがカップリングされており、このことは、この集団の質量は396 Da高いことを意味する、等々。可能な必要な電荷タグは、その後N末端に上記方法によりさらに付加することができる。他の可能性は、電荷タグを最初に固相に結合し、その後、コンビナトリアル合成を続けることである。

【0032】

別の方法としては、検出範囲を縮小することができるよう同じ極性のいくつかの一定の電荷を同時に結合することである。質量分光分析計では、2つの電荷を有する分子は、相当する半分の質量で観察される。このことは、質量分光分析計の解析度が質量が大きくなるにつれて極端に低減する場合には有利である。所定の正の電荷をプローブに適用させる方法は以前に言及されている。負の所定の電荷も同様の利点を有する。

正および負の電荷は、同様の方法により製造することができる。

【0033】

従って、質量タグに関連して記載したことは、電荷タグの局在、数およびコンビナトリアル法にも当てはまる。それゆえ、分析の感度は、核酸プローブのライブラリーの5'または3'末端にて電荷タグすることにより向上させることができる。このことは、ランダム化されていない位置へアルキルホスホネートを導入することにより(下記参照)中性電荷が別の仕方でも生成される場合には、特に当てはまる。電荷タグの付加と必然的に関連している質量タグの付加により、ホスホ

ロチオエート基の開裂により生じる断片の分析が容易になる。ある位置での好ましい開裂を得るために、ホスホロセノエートもまた用いることができる。

本発明の方法の他の好ましい態様では、プローブは修飾した核酸分子である。

特に好ましい態様では、これらの修飾した核酸分子は、PNA、アルキル化ホスホロチオエート核酸またはアルキルホスホネート核酸である。

【0034】

別の好ましい態様では、本発明のプローブは、コンビナトリアル固相合成により製造される。これは、たとえば、PNA純物質の合成にも商業的に利用されている一般的なBoc固相合成により行われる。この場合、アデニン、グアニン、シトシン若しくはチミンの塩基の4つとも全て、または、そのうちの1つより多くが、これらが導入されない場合には確定したプローブPNAの配列内の選択された位置で隣り合わせて導入される。このことは、固相合成の工程において1つのみならず幾つかの合成構築単位を用いることにより起こる。これらの位置をいくつか変えることにより、PNAライブラリーが生成される。PNA合成の後、遊離の末端アミノ官能基において電荷タグを付加することができる。これにより、MALDIによるPNA分析の動的範囲が向上する。

【0035】

それゆえ、特に好ましい態様では、種々の構築ブロックは、その質量、または、それから合成されたプローブの質量が質量分光分析により区別できるように仕方で固相合成においてマーキングされる。このマーキングは、塩基に対応する仕方でその骨格に異なる質量修飾を導入することにより達成される(図7)。このようにして、合成したプローブは、その配列に特異的な質量を得る。もしもプローブがMALDI標的に固定化した標的DNAに結合すれば、MALDI実験でアクセス可能な質量についての情報は、ハイブリダイズしたPNAプローブの配列に関する疑う余地のない結論を引き出すことを可能にする。

【0036】

本発明の方法の他の特に好ましい態様では、塩基構築ブロックは、メチル基、エチル基、プロピル基、分枝状若しくは直鎖状アルキル基、ハロゲン置換された分枝状若しくは直鎖状アルキル基、アルコキシアリール基、アルキルアリール基

載の結合の開裂は不完全な仕方であってもよい。これにより、より大きい断片を統合して配列情報を確保することが可能になり、またはあいまいな部分については配列情報を具体化することが可能になる。ランダム化位置における特異的な結合の開裂は、ライブラリーの合成時にすでに導入したホスホロチオエート基を挿入することにより達成される。これらはまずハロゲン化ヒドロキシアリール基によりヒドロキシアリール化され、ついでアルカリ条件下で選択的に切断され得る。別法として、ランダム化された位置の隣にウラシルが挿入されるように試料を構築することもできる。ついで、ウラシルDNAグリコシラーゼとそれに続くアルカリ処理により、この位置で骨格を切断することができる。

【0040】

通常、マトリックスは、高い吸光係数並びに選択したレーザー波長での電荷生成の良好な支持を示すような仕方で選択する。本発明の方法の他の好ましい態様において、レーザー光によるプローブの脱着を支持するマトリックスは、アセトン中の α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸の1:9ないし9:1の比、好ましくは1:1の比の溶液、または α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸またはシナピン酸またはそのメチル誘導体との1:9ないし9:1の比、好ましくは1:1の比の混合物であるからなる。

【0041】

本発明の方法の他の好ましい態様において、マトリックスは、 α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、または α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸またはシナピン酸またはそのメチル誘導体との1:99ないし99:1の比、好ましくは1:1の比の混合物からなり、これはMALDIプローブ支持体にアセトン、イソプロパノール、アセトニトリル、エタノール、メタノールまたは水またはこれら溶媒の2またはそれ以上の混合物中の溶液として適用する。

【0042】

所定の位置でのある構築ブロックへの質量タグの上記原理は種々の部分ライブラリーのために用いることができ、ついでそれらを合わせてより大きなライブラリーとすることができる。

、アリールアルキル基、アルコキシアリール基またはアリールオキシアリール基、または、その重水素化若しくは他の仕方での同位体変異体でマーキングされる。非修飾の構築ブロックを用いることにより、分子の質量はせいぜい塩基組成に関する結論を引き出すことができるだけで、その配列については結論を引き出すことができないので、PNAライブラリー内のいずれかのランダムな位置で特徴的である質量タグを付加した構築ブロック(すなわち、骨格で置換されたPNAモノマー)を用いる。このように、位置xにおけるある塩基の合成構築ブロックは、位置yにおけるものとは異なる質量を持つので、塩基の同じ全体組成を有する異なる配列のものでさえも分子質量により識別することができる。対応する置換塩基は、ライブラリー合成の上記性質に基づいていずれかの可能な配列が所定の質量に明確に対応するように数値により選択される。

【0037】

核酸プローブライブラリーの合成は合成機により、種々のヌクレオシド誘導体(通常、ホスホルアミダイト)の混合物をランダム化する位置に挿入することにより行う。その結果得られるライブラリーはまた、上記方法においてプローブとしても用い得る。異なる配列を識別するため、たとえば、ランダム化した位置での所定の部位に位置する所定のホスホジエステル結合にて特異的な結合の開裂を行わなければならない。

【0038】

本発明の方法の他の好ましい態様では、プローブは、プローブの開裂を可能にする少なくとも1つの修飾をランダム化されるヌクレオチドとは離れた所定の部位に有する。

特に好ましい態様では、この修飾はホスホロチオエート基および/またはRNA塩基および/またはホスホジエステル結合の導入である。

【0039】

プローブが3つのランダム化された位置を含む場合、少なくとも2つのそのような結合開裂が必要とされる(図10)。ついで、それぞれ1つのランダム化された位置を含む3つの断片が得られ、これらはそれゆえ、他の仕方では知られている質量組成に基づき、変異塩基に関する直接的な結論を得ることを可能にする。記

それゆえ、別の好ましい態様では、プローブは異なる質量および/または電荷タグを持つ部分ライブラリーとして製造される。特異的に分析した質量から特定の部分ライブラリーに関する結論を得ることができるように、部分ライブラリーをその合成に際して質量タグを付加する必要がある。このことは、固相合成でPNAライブラリーに容易に結合させることができる天然アミノ酸により意図的に行われる。種々の部分ライブラリーを質量タグで標識することにより、全体のライブラリーの分析に自由に用いることができる質量の範囲が有意に増大される。

【0043】

さらに、本発明は、場合により核酸分子が結合した、プローブおよび/またはプローブ支持体を含むキットに関する。タンパク質支持体は、上記のように、その表面を前処理してあり、それゆえ核酸の結合が可能である。好ましくは、前処理は化学的な方法により行われる。

本明細書中に言及した多数の刊行物は、参照のため本明細書中に引用する。

【0044】

実施例により本発明を説明する。

実施例1: 本発明による全体的な方法の記載

化学的に修飾したPCR生成物の固定化を可能とする物質でMALDI標的をコーティングする(たとえば、NH₂官能化表面)。標的DNAのアレイを該表面上に移し、結合させる。このアレイは、記載した仕方で調製したプローブのライブラリーとハイブリダイズする。プローブライブラリーの相補的成分は、対応標的DNAに結合する。ついで、結合しなかったプローブを除去するため、充分に洗浄する。マトリックスを適用し、MALDI標的を質量分光分析計に移す。標的DNAが見出される各点にレーザーを狙いをつけ、これら標的DNAが結合したプローブの質量分析を行う。

【0045】

実施例2: 電荷タグを有するPNA-ライブラリーの分析

PNAのライブラリーは、本明細書に記載した合成において電荷タグで標識する。PNAのライブラリーを50%アセトニトリル中に溶解し、希釈する。MALDIマトリックス(この場合には、アセトン中の α -シアノ-4-メトキシ桂

皮酸と α -シアノ-4-ヒドロキシル桂皮酸メチルエステルとの1:1混合物)をMALDI標的に適用する。溶媒を直ちに蒸発させる。ついで、0.5 mlのCT-PNA溶液を乾燥マトリックスに加える。溶媒を蒸発させた後、MALDI標的を質量分光分析計に移し、プローブを分析する。その結果を図5に示す。

【0046】

実施例3: CT-PNAによる標的DNAのアレイの分析

記載の仕方でコンビナトリアル製造したCT-PNAのライブラリーを、MALDI標的に固定化した標的DNAのアレイとハイブリダイズさせる。標的DNA中に相補的配列を見出したプローブは結合する。ついで、ライブラリーの残留成分を除去するため、MALDI標的を洗浄する。マトリックスをMALDI標的に加え、標的を分析のため質量分光分析計に移す(図1)。未知の標的DNAをハイブリダイズしたプローブにより特徴付ける。種々の標的DNAの類似性は、同じプローブに結合するという事実により特徴付けられる。

【0047】

実施例4: プローブによる標的DNAのアレイの分析

プローブを個々に調製し、ついで合わせてライブラリーとする。重要なことは、2つの異なるプローブによって質量が占領されないことである。このプローブのライブラリーを用いて、固定化した標的DNAのアレイへハイブリダイゼーションさせる。結合しなかったプローブを洗い落とす。マトリックスを適用し、結合したプローブを質量分光分析計で分析する。

【0048】

実施例5: 部分ライブラリーの製造およびMALDI-分析

配列に対する質量の明らかな関係を有するPNA-ライブラリーのための好ましい例を図8および表1に示す。他のランダムなPNAにおいては、コンビナトリアル固相合成において3つの位置を変化させなければならない。これは、4つの異なる塩基により64の可能な化合物に対応する。本実施例では、表1に示した構成要素を用いて2つの別個の合成を行う。合成2では2つのバリン単位の導入によりさらに質量タグで標識してある。各部分合成から、すべてその質量により区別できる32の化合物が得られる。両部分ライブラリーを合わせて、それぞ

れ特異的な質量を有する64の異なる配列のライブラリーとすることができる。このライブラリーについて計算したMALDI-質量スペクトルを図8に示す。64のピークは重複しない;各ピークは、3つのランダム化した位置(それぞれ4塩基)でのPNAライブラリーからの特異的配列に対応する。

【0049】

実施例6: MALDIプローブ支持体の表面処理

本発明の方法の好ましい態様において、MALDIプローブ支持体の表面をまずシリケートでコーティングし、ついでシラン化によりエポキシ官能化する。別法として、エポキシ官能化アクリルポリマーを金属表面に適用することもできる。標的DNAはエポキシ官能基により表面に共有結合される。特に好ましい態様において、固定化すべきDNAにまず第一級アミノ官能基を付与する。ついで、反応しなかったエポキシ官能基を過剰のアミンで不活化し、ついで実施例4に従って方法を続ける。

【0050】

実施例7: 448プローブのプローブライブラリーの構築

最後の実施例に記載した方法に従って7の合成を行い、ついで質量/電荷タグをカップリングする。

質量範囲

- | | |
|--|-------------|
| 1. 64 プローブ: 電荷タグ-TCP ₁ GAP ₂ GAP ₃ G | 2600-2800Da |
| 2. 64 プローブ: 電荷タグ+2000a質量タグ-TCP ₁ AGP ₂ GAP ₃ G | 2800-3000Da |
| 3. 64 プローブ: 電荷タグ+4000a質量タグ-TCP ₁ AGP ₂ AGP ₃ G | 3000-3200Da |
| 4. 64 プローブ: 電荷タグ+6000a質量タグ-TCP ₁ AAP ₂ AGP ₃ G | 3200-3400Da |
| 5. 64 プローブ: 電荷タグ+8000a質量タグ-TCP ₁ AAP ₂ GAP ₃ G | 3400-3600Da |
| 6. 64 プローブ: 電荷タグ+10000a質量タグ-TCP ₁ GAP ₂ GAP ₃ G | 3600-3800Da |
| 7. 64 プローブ: 電荷タグ+12000a質量タグ-TCP ₁ GAP ₂ AGP ₃ G | 3800-4000Da |

上記一連の合成において、第6の合成は内部対照として働くものである。別法として、以下の合成を行うこともできる:

- | | |
|--|-------------|
| 6. 64 プローブ: 電荷タグ+10000a質量タグ-TCP ₁ GGP ₂ GAP ₃ G | 3600-3800Da |
|--|-------------|

【0051】

表面を、2回蒸留した水で数回洗浄する。乾燥したプローブ支持体を、3-グリスジルオキシプロピルトリメトキシシランとトリメトキシ[2-(7-オキサビシクロ[4.1.0]ヘプト-3-イル)エチル]シランとの1:1混合物(0.5 μ l/mm²)でコーティングし、加熱プレート上で40分間インキュベートする。プレートをアセトンで十分に洗浄し、55℃で15分間乾燥させ、真空で貯蔵する。

【0055】

3. リンカーによるDNAの官能化:

態様A:

ホスホロチオエート架橋を用いて合成したDNAを、DMF中の過剰のS I A B (4-(ヨードアセトアミド)安息香酸N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル、Pierce Chemical、ロックフォード、イリノイ、米国)で官能化する。溶媒を真空蒸発させ、得られた黄色の残渣を酢酸エチルで数回洗浄し、ついで乾燥させる。これら条件下では、もっぱらヨードアセトアミド官能基が反応する。N-ヒドロキシスクシンイミドエステルは、固定化に際してアミノ官能基とのその後の反応に利用できる。

【0056】

態様B:

アミノ官能化オリゴヌクレオチドを無水DMSO中の過剰のS I A Bと室温で反応させる。精製を(A)と同様に行う。これら条件下、S I A Bはそのヨードアセトアミド官能基で約50%反応し、そのN-ヒドロキシスクシンイミドエステル官能基で約50%反応する。ついで、固定化を、1Dに従って処理した金属プレートと逆に行うことができる。

態様C:

態様(A)および(B)はまた、ハロゲンアルキルカルボン酸-NHS-エステルを用いて同様に行うことができる。しかしながら、長い反応時間とより高い温度が必要である。

【0057】

4. 前以て処理した金属プレート上へのDNAの結合:

実施例8: 金属表面への標的DNAの共有結合固定化

1. 金属表面のシリケートおよびシランコーティング:

態様A:

50 mgの三硅酸ナトリウム(Aldrich)を加熱および攪拌下に600 μ lの水中に溶解し、100 μ lのメタノールを滴下する。静置すると、溶液は15分以内に濁ってはならない。この溶液の均等なコーティングを、前以て洗浄にしたプレートに柔らかな布で適用し、室温にて乾燥させる。プレートをさらに50℃にて15分間乾燥させ、メタノールで洗浄する。ついで、50℃で再度加熱し、重合しなかったシリケートを水で洗い落とす。「ガラス様の」金属プレートを3-(アミノプロピル)トリエトキシシランの溶液(アセトン:水/95:5中に2%)で20分間処理し、メタノールで洗浄し、50℃で乾燥させる。

【0052】

態様B (好ましい態様):

(A)に記載したように、5%の3-(アミノプロピル)トリエトキシシランをシリケート溶液に加え、その均等な層を柔らかな布で金属プレートに適用する。室温で乾燥させた後、表面を濃塩酸の蒸気に30秒間晒すと曇って不透明になる。プレートを50℃にて15分間乾燥させ、メタノールおよび水で洗浄し、ついで再び乾燥させる。

【0053】

態様C:

前以て洗浄にしたプレートを3-(アミノプロピル)トリエトキシシランの溶液(アセトン:水/95:5中に2%)で30分間シラン化する。プレートを乾燥させ、メタノールで洗浄し、50℃にて15分間加熱し、水洗する。

態様D:

態様A、BおよびCと同様にして、3-(メルカプトプロピル)トリエトキシシランを用いてチオールで官能化することも可能である。

【0054】

2. エポキシシランによる金属担体の前処理:

金属プローブ支持体を上記と同様にしてシリケートでコーティングする。その

態様A:

官能化したDNAを無水DMSO中の酢酸ナトリウムの飽和溶液に溶解し、コーティング金属プレートに適用する。30分の反応時間の後、残留する溶媒を除去し、隣接するスポット間の相互混入を避けるような仕方でも金属プレートをまず1M塩化アンモニウム溶液で、ついで2回蒸留水で洗浄する。この手順を3回繰り返す。ついで、大量の2回蒸留水を用いて再度洗う、その後ハイブリダイゼーションを行うまで金属プレートを真空貯蔵する。

態様B:

(A)と同様にして、非修飾DNAを用いた非共有結合固定化もまた可能である。この場合は、洗浄手順を1M塩化アンモニウム溶液なしで行う。

【0058】

態様C:

MALDI標的への標的DNAの固定化はまた、以下のようにしても行うことができる。アミノ官能化DNA(1.5ナノモル)を固定化緩衝液(1M K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH7.5)に加える。シラン化により官能化した表面をこの溶液でコーティングし、室温にて16~20時間静置する。その後、プレートをハイブリダイゼーション緩衝液で数回洗浄し、乾燥させる。

【0059】

態様D:

エポキシ官能化固相上への標的DNAの固定化は以下のようにして行うことができる。10mgの支持体(Eupergit C250L, Roehm Pharma Polymere)を1mlの固定化緩衝液(1M K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH7.5)中に懸濁する。1.5ナノモル固定化すべき標的DNAに加え、穏やかに攪拌しながら室温で24時間インキュベートする。過剰分を除去し、反応しなかったエポキシ官能基を1Mグリシン溶液で処理して不活化する。残渣を除去し、支持体を数回洗浄する。そのようにして、固定化DNAを-20℃にて一層長期貯蔵できる。

【0060】

5. ハイブリダイゼーションおよび試料の調製:

固定化標的DNAへのPNAプローブ(または核酸プローブ)のハイブリダイ

例えばGCN4/AP1もまた通している。

【0063】

他の態様は、ストレプトアビジンをコーティングしたマグネチックビーズへのビオチン化標的DNAの結合である。この標的DNAをプローブライブラリーで分析し、ついでマグネチック粒子をMALDI標的に移し、そこでプローブをマトリックスおよびわずかな加熱によりマトリックスへ移す。

【0064】

【表1】

塩基	位置1	位置2	位置3
A	H	iPr	H
T	H	Me	iPrOCH ₂
C	H	H	iPrOCH ₂ *
G	H	iBu	H*

表1: 明らかな質量/配列関係を有する質量タグ標識ライブラリーを製造するためにPNAサブユニットに適用される置換基。*: 2つのバリン単位で質量タグ標識した第二の合成。対応する合成成分は図9に示してある。

【0065】

【表2】

ゼーションは、各プローブに対応して調節した温度にてPBS緩衝液中で起こる。標的をまずPBS緩衝液で洗浄し、ついで2回蒸留水で再び洗浄する。金属プレートを真空乾燥させ、ついでMALDIマトリックス(α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸、アセトン中に1%;または電荷タグPNA/核酸の方法については対応メチルエステルと同様に;または好ましい態様として、電荷タグ標識PNAのための α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸との1:1混合物)で各スポットを別々にコーティングする。別法として、マトリックススプレーを用いたフラットコーティングを行うこともできる。速やかな乾燥プロセスにより、アレイ内の拡散が防がれる。

【0061】

5. 好ましい態様:

好ましい態様において、2. A.に従ってホスホロチオエート架橋で合成したS1ABで官能化したDNAの、1. B.に従って製造した表面上への結合を、室温での無水DMSO中での反応により金属プレート上で行う(30分間)。電荷タグ標識プローブPNA/DNAによるハイブリダイゼーションの後、MALDI標的を2回蒸留水で洗浄し、乾燥させ、分離した各スポットについて α -シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルと α -シアノ-4-メトキシ桂皮酸との混合物でフラットコーティングする(4.と同様にして)。

【0062】

6. タンパク質コーティング:

他の態様は、MALDI標的の金属表面のタンパク質でのコーティングである。これには、遺伝子32、配列非特異的な仕方でも単一のDNAに結合するタンパク質が適している。このタンパク質で標的をコーティングした後、標的DNAのアレイをこれに適用できる。標的DNAがcDNAであるなら、これらはPCRにおいてオリゴ-dT(たとえば、dT T T T T T T T T T T T T T T)でプライミングした。オリゴ-dTは、遺伝子32と強く相互作用する。遺伝子32へのオリゴ-dTの共有結合は、短いUV光を用いた光架橋により達成できる。^{36,37} MALDI標的の固定化後、記載した仕方でもプローブのライブラリーを用いて標的DNAのアレイを分析できる。配列特異的なタンパク質/DNA相互作用、た

文献

- Hoheisel, J.D.およびLehrach, H. 1993. Use of reference libraries and hybridization fingerprint for relational genome analysis. FEBS. 325: 118-122.
- Scholler, P., Karger, A.E., Meier-Ewert, S., Lehrach, H., Delius, H. および Hoheisel, J.D. 1995. Fine-mapping of shotgun template-libraries; an efficient strategy for the systematic sequencing of genomic DNA. Nucleic Acids Res. 23: 3842-3849.
- Brenner, S. 1994. Methods for sorting polynucleotides using oligonucleotide tags. 米国特許. 5,604,097.
- Brenner, S. 1995. Minimally cross-hybridizing sets of oligonucleotide tags. 米国特許. 5,635,400.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R. および Smith, L.M. 1994. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays of glass supports. Nucleic Acids Res. 22: 5456-5465.
- Church, G.M.およびKieffer-Higgins, S. 1988. Multiplex DNA sequencing. Science. 240: 185-188.
- Church, G.M.およびKieffer-Higgins, S. 1990. Multiplex analysis of DNA. 米国特許. 5,149,625.
- Arlinghaus, H.F., Kwoka, M.N., Guo, X.-Q. および Jacobson, K.B. 1997. Multiplex DNA sequencing and diagnostics by hybridization with enriched stable isotope labels. Anal. Chem. 69: 1510-1517.
- Nielsen, P.E., Buchardt, O., Egholm, M. および Berg, R.H. 1993. Peptide nucleic acids. 米国特許. 5,539,082.
- Buchardt, O., Egholm, M., Berg, R.H. および Nielsen, P.E. 1993. Peptide nucleic acids and their potential applications in biotechnology. Trends in Biotechnology, 11: 384-388.
- Karas, M. および Hillenkamp, F. 1988. Laser desorption/ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301.
- Vestal, M.L., Juhasz, P. および Martin, S.A. 1995. Delayed extraction matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 9: 1044-1050.
- Gut, I.G. および Beck, S. 1995. DNA and Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biogry: Current Innovations and Future Trends. 1: 147-157.

【表3】

¹⁴ Gut, I.G. および Beck, S. 1995. A procedure for selective DNA alkylation and detection by mass spectrometry. *Nucleic Acids Res.* 23: 1367-1373.

¹⁵ Gut, I.G. および Beck, S. 1995. Method of nucleic acid analysis. 特許 WO95/27581.

¹⁶ Gut, I.G., Jeffery, W.A., Pappin, D.J.C. および Beck, S. 1997. Analysis of DNA by 'charge tagging' and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11: 43-50.

¹⁷ Butler, J.M., Jiang-Baucom, P., Huang, M., Belgrader, P. および Girard, J. 1996. Peptide nucleic acid characterization by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 68: 3283-3287.

¹⁸ Kerough, T., Baker, T.R., Dobson, R.L.M., Lacey, M.P., Riley, T.A., Hasselfield, J.A. および Hesselberth, P.E. 1993. Antisense DNA oligonucleotides II: the use of matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry for the sequence verification of methylphosphonate oligodeoxynucleotides. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7: 195-200.

¹⁹ Ross, P.L., Lee, K. および Belgrader, P. 1997. Discrimination of single-nucleotide polymorphisms in human DNA using peptide nucleic acid probes detected by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 4197-4202.

²⁰ Lowe, G. 1995. Combinatorial Chemistry. *Chem. Soc. Rev.* 24: 309.

²¹ Jung, G., Früchtel, J.S. 1996. Organische Chemie an fester Phase. *Angew. Chem.* 108: 19-46.

²² Choong, I.C., Ellman, J.A. 1998. Solid-Phase Synthesis: Applications to Combinatorial Libraries. *Ann. Reports in Med. Chem.* 31: 309.

²³ Pirrung, M.C. 1997. Spatially Addressable Combinatorial Libraries. *Chem. Rev.* 97: 473.

²⁴ Cook, P.D., Kiely, J. および Sprinkle, K. 1994. Peptide nucleic acid combinatorial libraries and improved methods of synthesis. 米国特許 5,539,083.

²⁵ Nielsen, P.E. Peptide nucleic acids: a new dimension to peptide libraries and aptamers. *Methods in Enzymology*. 426-433.

²⁶ Metzger, J.W., Stevanovic, S., Brünjes, J., Wiesmüller, K.-H., Jung, G. 1994. Electrospray Mass Spectrometry and Multiple Sequence Analysis of Synthetic Peptide Libraries. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 6: 425-431.

²⁷ Loo, J.A., DeJohn, D.E., Andrews, P.C. 1996. Application of Mass Spectrometry for Characterizing and Identifying Ligands from Combinatorial Libraries. *Ann. Reports in Med. Chem.* 31:319.

²⁸ Pomerantz, S.C., McCloskey, J.A., Eaton, B.C. 1997. Deconvolution of Combinatorial Oligonucleotide Libraries by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 3861.

²⁹ Carr, S.A., Benkovic, S.J., Winograd, N. 1996. Evaluation of Mass Spectrometric Methods Applicable to the Direct Analysis of Non-Peptide Bead-Bound Combinatorial Libraries. *Anal. Chem.* 68: 237.

³⁰ Uhlen, M. 1988. *Nucleic Acids Res.* 16, 3025-3038.

³¹ Chrisey, L.A., Lee, G.U. および O'Ferrall, C.E. 1996. Covalent attachment of synthetic DNA to self-assembled monolayer films. *Nucleic Acids Res.* 24: 3031-3039.

³² Timofeev, E.N., Kochetkova, S.V., Mirzabekov, A.D. および Florentiev, V.L. 1996. Regioselective immobilization of short oligonucleotides to acrylic copolymer gels. *Nucleic Acids Res.* 24: 3142-3148.

³³ O'Donnell, M.J., Tang, K., Köster, H., Smith, C.L. および Cantor, C.R. 1997. High-density, covalent attachment of DNA to silicone wafers for analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Anal. Chem.* 69: 2438-2443.

³⁴ Cantor, C.R. 1995. Methods of preparing probe array by hybridization. 米国特許 5,631,134.

³⁵ Bruick, R.K., Koppitz, M., Joyce, G.F. および Orgel, L.E. 1997. A simple procedure for constructing 5'-amino-terminated oligodeoxynucleotides in aqueous solution. *Nucleic Acids Res.* 25: 1309-1310.

³⁶ Hockensmith, J.W., Kubasek, W.L., Voracek, W.R. および von Hippel, P.H. 1993. Laser cross-linking of proteins to nucleic acids. *J. Bio. Chem.* 268: 15712-15720.

³⁷ von Hippel, P.H. 1994. Protein-DNA recognition: New perspectives and underlying themes. *Science*. 263: 769-770.

【図面の簡単な説明】

【図1】 質量分光分析装置によるフィンガープリンティングの模式図。

(1) コンビナトリアルにより製造した質量の区別できるプローブのライブラリー。

(2) このライブラリーを、MALDI標的に固定化されている標的DNAとハイブリダイズさせる。該標的DNA中の配列に相補的な配列を有するプローブのみが該標的DNAに堅固に固定化される。充分な洗浄の後、MALDIマトリックスを適用する。

(3) ハイブリダイズしたプローブを質量分析により同定する。

【表4】

【図2】 MALDI標的のコーティングおよび標的DNAのアレイの固定化の模式図。非共有結合固定化では二官能性リンカーは省いてある。

【図3】 N-末端質量/電荷タグ。

核酸または修飾形態の核酸の5'側またはPNAのN末端に電荷タグ標識を導入することができる。この電荷タグは、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル官能基および第四級アンモニウム基を有する。これら2つの官能基は、基R₁により隔てられている。R₁は電荷タグの質量変数として働く（電荷タグのカップリングは、氷上、水溶液中、弱塩基性（pH 8.5）にて行う。反応は30分で完了する）。

【図4】 非修飾PNAと電荷タグ標識PNAとの1:1混合物。

電荷タグおよび非修飾PNAを、1:1混合にてα-シアノ-4-ヒドロキシル桂皮酸メチルエステルマトリックスを用いて分析した。異なる感度が明白である。1塩基短くなり電荷タグ標識した誤り配列（1983Da）では、非修飾の配列（2074Da）に比べて有意に強いシグナルを生じる。

【図5】 10量体PNAライブラリーの質量分布。

配列中の2つの位置を、変性塩基（TCGA）を用いて合成する。配列はNTTGTTTTCNである。その結果、質量によって区別する9のPNAが生じる。PNAライブラリーにおいて、CC=2810Da、CT=TC=2825Da、CA=AC=2834Da、TT=2840Da、TA=AT=2849Daは、CG=GC=2850Da、AA=2858Da、TG=GT=2865Da、AG=GA=2874DaおよびGG=2890Daと区別できない。常に、同位体溶液を観察する。全PNAライブラリーには、「ホットボット反応」において電荷タグが付与された。MALDI分析を、α-シアノ-4-メトキシ桂皮酸とα-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステルとの1:1マトリックス混合物中で行った。

【図6】 質量/電荷タグ。

2つの変性して合成した位置を有する10量体PNAライブラリーを質量/電荷で標識した。配列はNTTGTTTTCNである。α-シアノ-4-ヒドロキシ桂皮酸マトリックス中の出発物質と標識PNAライブラリーとの混合物を示す。

ライブラリーに固定電荷担体を適用する利点が明らかである。電荷タグ標識したライブラリーからのシグナルは、等濃度で検出されるが、非修飾PNAでは検出されない。1塩基短い誤配列は検出できる。

【図7】 平行して行う質量タグ合成並びに質量タグ構築ブロックL（ランダムな位置）を用いることによるPNAライブラリーの合成の原理。

このランダムな位置において、PNA骨格上に異なる置換基を有する種々の塩基を（質量タグとして）用いる。対応PNA分子の質量は、その配列に明らかに割り当てられる。

【図8】 PNAライブラリーの計算したMALDI質量スペクトル。

32個の異なる配列を用いた2つの異なる固相合成（そのうちの一方は質量タグ標識してある）から64の異なる質量ピークが生じ、これらはそれぞれ、4つの塩基（それぞれ、A、C、G、Tを挿入）で3の可変位置にてPNAライブラリーからの特異的な配列に割り当てられる。計算は、表1に示す置換基に基づく。計算のため、コンピュータープログラムMASP（著作権Christoph Steinbeck博士）を用いた。

【図9】 質量の区別するPNAライブラリーの合成のために用いる、コンビナトリアルBoc固相合成に使用可能なPNA合成構築ブロック。表1に示す質量タグ標識した構築ブロックを説明する。

【図10】 特異的な結合切断によるプローブの配列分析。

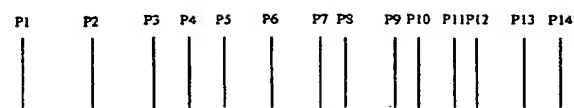
DNAプローブのライブラリーの種々の配列はまた、ランダムな位置（N=A、G、CまたはT）での特異的な結合切断によっても質量スペクトルで同定できる。すでに固相合成の間にこれらの位置にホスホロチオエート官能基が導入しており、この部位でDNAを特異的に開裂することができる（たとえば、ヨードエタノールで）。このことは、断片の正確な化学的性質を考慮することなく図式的に表してある。断片の質量は、配列の大部分がわかっていることから、完全なシーケンシングを行うことなく全配列の明白な決定を可能とする。置換基R₁は任意のさらなるDNA配列を示し、R₂はさらなる任意の配列またはHを示す。R₃は-OH（ホスホジエステル）またはアルキル（アルキルホスホネート）を示す。

【図11】 「電荷タグ」PNAブローブ混合物CCXCAGCC (X=A、G、C、T) は、Eupergit上に固定化した標的DNAにハイブリダイズし、CCCCAGCCが相補の配列である。より低いスペクトルは出発混合物を示し、より高いスペクトルは相補的なCCCCAGCC配列の明らかに好ましいハイブリダイゼーションを示す。

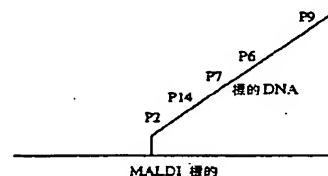
【図12】 測定の間にプローブ支持体を動かさことなく4-ヒドロキシ- α -シアノ桂皮酸マトリックスの適用後に検出される、MALDIプローブ支持体に固定化した標的DNAに相補的な「電荷タグ」CCTCAGCC。

【圖 1】

1) プローブの質量分布



2) ハイブリダイゼーション



3) ハイブリダイズしたプローブの質量分布

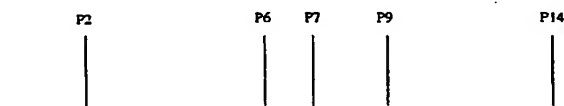


Fig. 1

【図2】

MALDI 標的への DNA の直接の固定化 (例示)

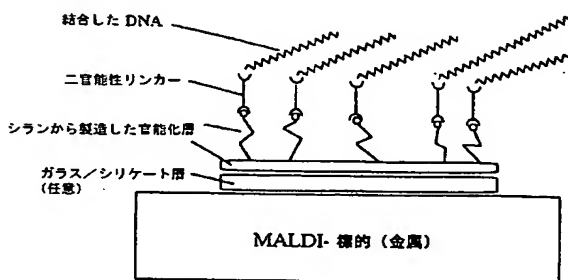


Fig. 2

【図 3】

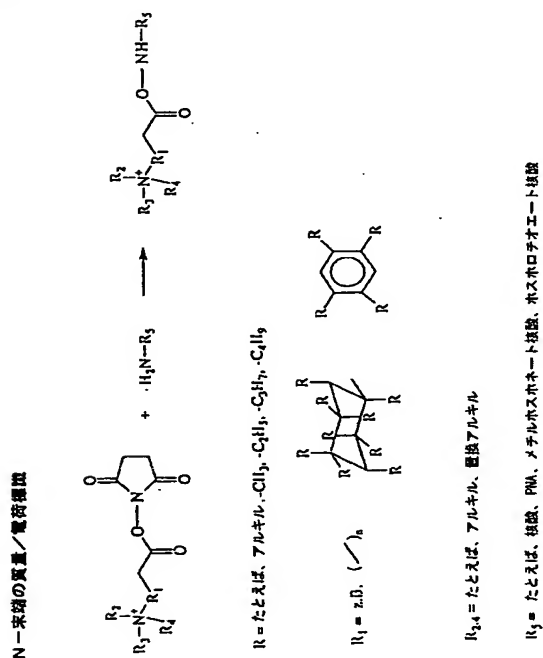


Fig. 3

【図 4】

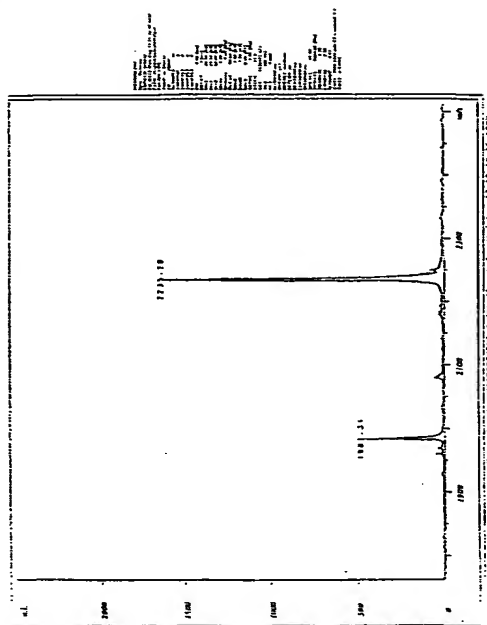


Fig. 4

【圖 5】

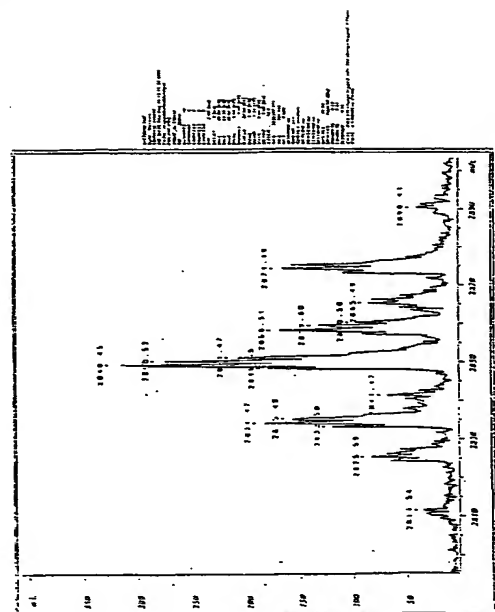


Fig. 5

【図 6】

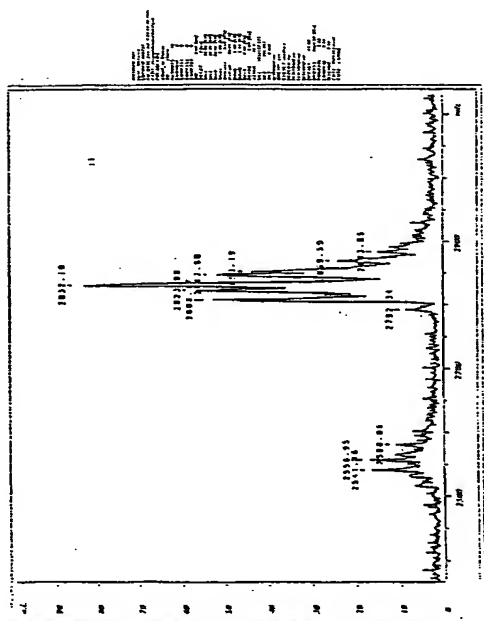


Fig. 6

【圖 7】

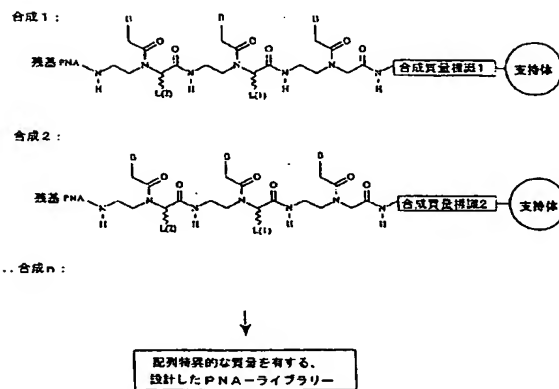


Fig. 7

【図8】

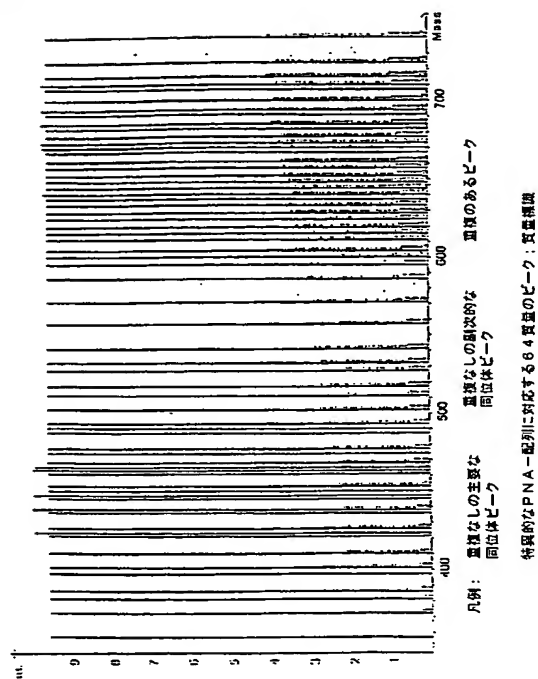


Fig. 8

【図9】

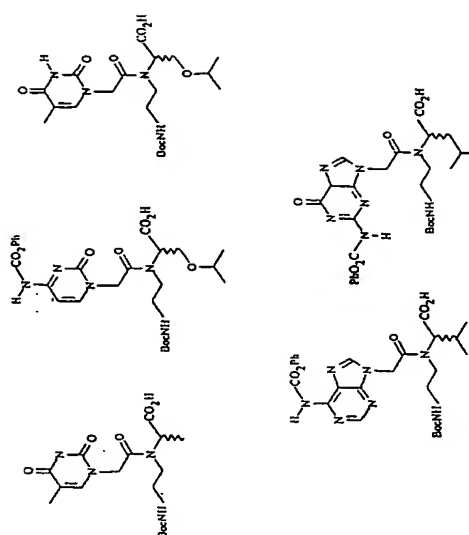


Fig. 9

【図10】

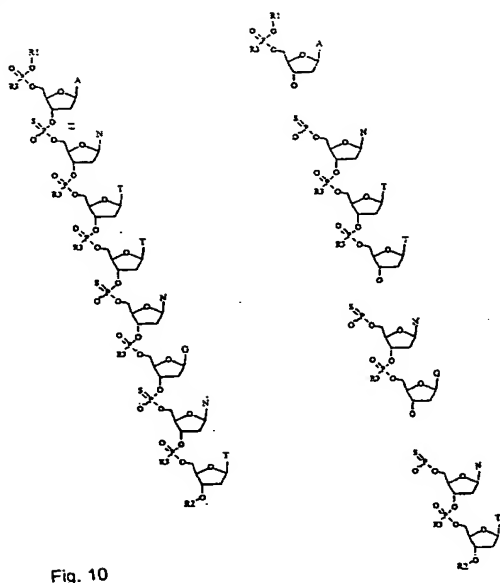
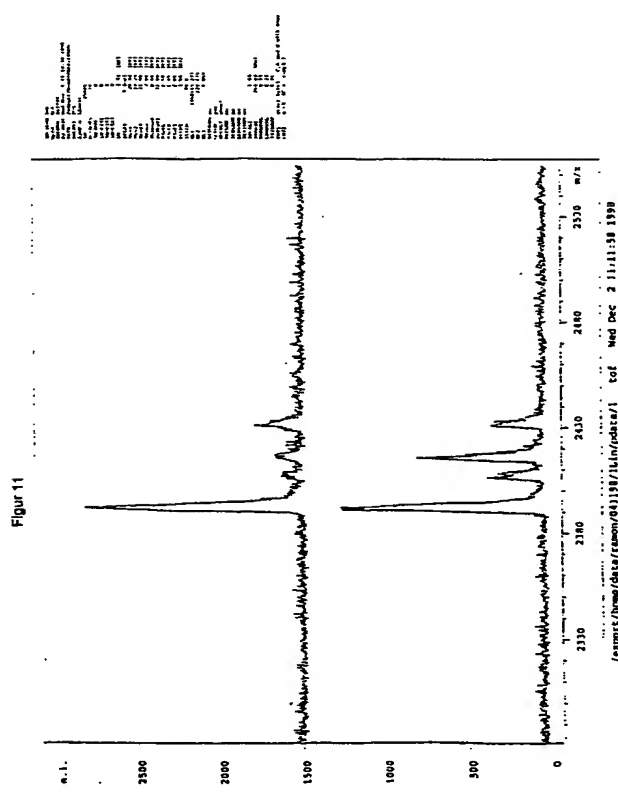
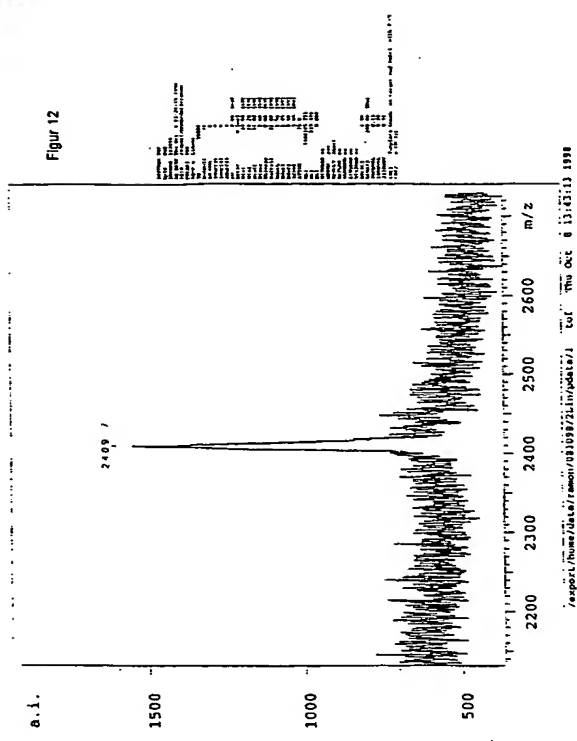


Fig. 10

【図11】



【図 12】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-コード(参考)
// C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 15/00	F
(71)出願人	B e r l i n, B R D		
(72)発明者	ハンス・レーラッハ		
	ドイツ連邦共和国デー14195ベルリン、		
	リュッツェルシュタイナーヴェーク50番		
F タ-ム(参考)	2G045 AA35 BB22 BB60 DA12 DA13		
	DA14 FA11 FA12 FA17 FB02		
	FB03 FB15		
	4B024 AA11 AA20 CA01 CA09 HA11		
	4B063 QA01 QA11 QQ42 QR56 QS34		
	QS36 QS39 QX01		

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C1201/68		Inter. Appl. No. PCT/EP 98/07911
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C120		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	LITTLE D P ET AL: "MALDI ON A CHIP: ANALYSIS OF ARRAYS OF LOW-FEMTOMOLE TO SUBFEMTOMOLE QUANTITIES OF SYNTHETIC OLIGONUCLEOTIDES AND DNA DIAGNOSTIC PRODUCTS DISPENSED BY A PIEZOELECTRIC PIPET" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, no. 22, 15 November 1997 (1997-11-15), pages 4540-4546, XP000727173 ISSN: 0003-2700 the whole document	1-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "S" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 August 1999		Date of mailing of the international search report 09/09/1999
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5515 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hagenmaier, S

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 f 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Initial Application No
PCT/EP 98/07911

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>GRIFFIN ET AL.: "GENETIC ANALYSIS BY PEPTIDE NUCLEIC ACID AFFINITY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY" NATURE BIOTECHNOLOGY, vol. 15, December 1997 (1997-12), pages 1368-1372, XP002113517 the whole document</p>	1-23
Y	<p>ROSS ET AL.: "DISCRIMINATION OF SINGLE-NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS IN HUMAN DNA USING PEPTIDE NUCLEIC ACID PROBES DETECTED BY MALDI-TOF MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, no. 20, October 1997 (1997-10), pages 4197-4202, XP002113518 the whole document</p>	1-23
Y	<p>ROSS P L & BELGRADER P: "ANALYSIS OF SHORT TANDEM REPEAT POLYMORPHISMS IN HUMAN DNA BY MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, 1 October 1997 (1997-10-01), pages 3966-3972, XP002094185 ISSN: 0003-2700 the whole document</p>	1-23
Y	<p>GUT ET AL.: "ANALYSIS OF DNA BY "CHARGE TAGGING" AND MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION/IONIZATION MASS SPECTROMETRY " RAPID COMMUNICATIONS IN MASS SPECTROMETRY, vol. 11, 1997, pages 43-50, XP002113519 the whole document</p>	1-23
Y	<p>EP 0 524 808 A (HOFFMANN LA ROCHE ;UNIV NEW YORK (US)) 27 January 1993 (1993-01-27) the whole document</p>	9
A	<p>KÖSTER ET AL.: "A STRATEGY FOR RAPID AND EFFICIENT DNA SEQUENCING BY MASS SPECTROMETRY" NAT.BIOTECH., vol. 14, 1996, pages 1123-1128, XP002113520 the whole document</p>	
	-/-	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 98/07911

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ARLINGHAUS H F ET AL: "MULTIPLYED DNA SEQUENCING AND DIAGNOSTICS BY HYBRIDIZATION WITH ENRICHED STABLE ISOTOPE LABELS" ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 69, no. 8, 15 April 1997 (1997-04-15), pages 1510-1517, XP000690164 ISSN: 0003-2700 the whole document</p>	
A	<p>WO 95 04160 A (ISIS INNOVATION ; SOUTHERN EDWIN (GB); CUMMINS WILLIAM JONATHAN (GB) 9 February 1995 (1995-02-09) the whole document</p>	
A	<p>WO 96 27681 A (IMP CANCER RES TECH ; GUT IVO GLYNNE (GB); BECK STEPHAN AUGUST (GB)) 12 September 1996 (1996-09-12) the whole document</p>	
P, A	<p>WO 98 31830 A (BRAX GENOMICS LTD ; THOMPSON ANDREW HUGIN (GB); SCHMIDT GUENTER (GB) 23 July 1998 (1998-07-23) the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 98/07911

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0524808 A	27-01-1993	AU 645915 B AU 2041992 A CA 2074214 A CA 2218875 A DE 69227076 D DE 69227076 T EP 0863213 A ES 2123542 T JP 2084412 C JP 5336971 A JP 8000073 B US 5538871 A	27-01-1994 25-02-1993 24-01-1993 24-01-1993 29-10-1998 02-06-1999 09-09-1998 16-01-1999 23-08-1996 21-12-1993 10-01-1996 23-07-1996
WO 9504160 A	09-02-1995	AT 159767 T AU 695349 B AU 7269194 A CA 2168010 A CN 1131440 A DE 69406544 D DE 69406544 T DK 711362 T EP 0711362 A EP 0778280 A ES 2108479 T FI 960403 A HU 73802 A JP 9501830 T NO 960370 A US 5770367 A	15-11-1997 13-08-1998 28-02-1995 09-02-1995 18-09-1996 04-12-1997 26-02-1998 22-12-1997 15-05-1996 11-06-1997 16-12-1997 29-01-1996 30-09-1996 25-02-1997 28-03-1996 23-06-1998
WO 9627681 A	12-09-1996	EP 0813609 A JP 11500924 T	29-12-1997 26-01-1999
WO 9831830 A	23-07-1998	AU 5570098 A NO 9932501 A	07-08-1998 01-07-1999

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1993)